

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-49830

(43)公開日 平成9年(1997)2月18日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
G 01 N 30/88			G 01 N 30/88	E
B 01 D 15/08			B 01 D 15/08	
B 01 J 20/26			B 01 J 20/26	H
G 01 N 30/48			G 01 N 30/48	R
33/543	5 2 1		33/543	5 2 1

審査請求 未請求 請求項の数4 OL (全8頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平7-203378

(22)出願日 平成7年(1995)8月9日

(71)出願人 000109543

テルモ株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号

(72)発明者 大西 賦人

神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地

テルモ株式会社内

(72)発明者 本村 忠広

神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地

テルモ株式会社内

(54)【発明の名称】 刺激応答型分離材料および分離精製方法

(57)【要約】

【課題】標的物質に対する高い特異性を有し、標的物質を簡便に回収できる分離材料及び分離システムを提供することを目的とする。

【解決手段】標的物質に対して親和性を有する領域と刺激応答性高分子鎖よりなる領域とを基材表面に有する。

〔特許請求の範囲〕

【請求項1】刺激応答性高分子鎖よりなる領域と標的物質に対して親和性を有する領域とを基材表面に有することを特徴とする刺激応答型分離材料。

【請求項2】刺激応答性領域よりなる分子鎖と標的物質に対して親和性を有する分子鎖とを有する共重合体を基材表面に有することを特徴とする請求項1に記載の刺激応答型分離材料。

【請求項3】刺激応答性高分子鎖よりなる領域と標的物質に対して親和性を有する領域とを基材表面に有する刺激応答型分離材料において、前記基材が多孔質体からなることを特徴とする刺激応答型分離材料。

【請求項4】刺激応答性高分子鎖よりなる領域と標的物質に対して親和性を有する領域とを基材表面に有する刺激応答型分離材料を用いて、標的物質を該分離材料に吸着させた後、該刺激応答性高分子鎖の高次構造を変化させることにより、標的物質を該分離材料より脱離させることを特徴とする物質の分離精製方法。

【発明の詳細な説明】

[0001]

【発明の属する技術分野】本発明は、標的物質に対して特異的親和性を有する物質と刺激応答性高分子とを利用した新規な分離材料、その製造方法及び分離方法に関する。

[0002]

【従来の技術】近年、細胞工学や遺伝子工学等の発展に伴い、細胞や遺伝子を利用した細胞治療や遺伝子治療の研究が盛んとなっており、目的とした細胞や生体物質を損傷させることなく分離する技術が重要となっている。また、バイオテクノロジーの発展により、生物工学的手法によるペプチド、蛋白質、糖蛋白質といった生理活性分子の生産が行われるようになってきており、細胞やバイオプロダクツの簡便で損傷の少ない分離精製技術が望まれている。

【0003】従来より化学工業分野で使用されている吸着・分配・蒸留・析出といった分離・精製の単位操作では、熱や有機溶媒の添加等により、被精製物質に対して大幅な環境変化を強いるため、前述の細胞やバイオプロダクトの分離には適していないことが多い。

【0004】細胞やバイオプロダクツの分離方法として、体積（分子量）や密度による方法（沈降速度法、密度勾配遠心法、ゲル濾過法等）、電場中での移動度の差による方法（電気泳動等）、等電点による方法（焦点電気泳動など）、2液相間への分配による方法（2層分配法、分配クロマトグラフィー）、固相への吸着性の差による方法（吸着クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー）等が知られている。

【0005】これらの分離方法の多くは、物理化学的性状が大きく異なる細胞成分の分離には適用できるものの、物理化学的性状が良く似た成分や細胞、例えばリン

バ球亜集団の分離などには適用が困難であった。この中で標的物質に対する選択性の高い方法は、アフィニティークロマトグラフィーであり、近年広く利用されるようになってきている。細胞を対象とするアフィニティークロマトグラフィーとしては、標的細胞の表層に存在する膜蛋白質等に対するモノクローナル抗体を結合したビーズやシャーレを用いた分離方法が報告されており、本方法による各種リンバ球の亜集団分離も報告されている。

(例えば、ジャーナル・オブ・イミュノロジカル・メソッド、第54号、251ページ、1983年に記載されているブラウンらの研究報告)。この抗体を用いた方法は、特異性が極めて高いことが利点であるが、欠点として、吸着した細胞の脱着が困難なこと、抗体が細胞表層の抗原に結合するための時間(接触時間)を長くすること、その結果、非特異的な吸着が増加すること、等があった。

【0006】前述の欠点を改良した方法としては、アビジン-ビオチンのような親和性の高い結合を利用して、短時間で分離材料に吸着させる方法がWO 91/1161

16で提案されている。すなわち、ビオチンで標識した抗体を予め時間をかけて標的細胞に結合させた後、アビジンを結合した分離材料に吸着させることにより、短時間で効率良く標的細胞を分離できることとなる。しかしながら、この方法では、物理的振動を用いて抗体と標的細胞の結合やアビジンとビオチンとの結合を解離することにより標的細胞の回収が行われているため、ビーズ同士の衝突等による細胞の損傷や機能低下が免れない。

【0007】細胞機能を損なわないように回収する方法としては、特開平2-211865号に記載された水に対する上限または下限臨界溶解温度が0～80℃にあるポリマーもしくはコポリマーで表面を被覆した細胞培養基材が報告されている。この方法は、温度により疎水性一親水性と相転移する温度応答性高分子を利用したものであり、温度応答性高分子が疎水性で収縮した状態の時に細胞を吸着させた後、温度を変化させ、親水性となって膨潤する時に吸着した細胞を脱着させる方法である。この方法の欠点は、細胞に対する特異性が低いため、種々の細胞が存在する液体から特定の細胞を回収することができないことがある。特にマクロファージ、白血

球、リンパ球等の多くは、曲率の小さい表面に吸着することが知られており、フィルターや不織布形状に加工したこの分離材料を用いて、特定のリンパ球などを選択的に回収することは不可能であった。

[0008]

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明は、標的物質に対する高い特異性を有し、標的物質を簡便に回収できる分離材料及び分離システムを提供することを目的とする。

[0009]

【課題を解決するための手段】上記発明の目的は以下の

刺激応答型分離材料及びその製造方法によって達成される。

(1) 刺激応答性高分子鎖よりなる領域と標的物質に対して親和性を有する領域とを基材表面に有することを特徴とする刺激応答型分離材料。

(2) 刺激応答性領域よりなる分子鎖と標的物質に対して親和性を有する分子鎖とを有する共重合体を基材表面に有することを特徴とする(1)に記載の刺激応答型分離材料。

(3) 刺激応答性高分子鎖よりなる領域と標的物質に対して親和性を有する領域とを基材表面に有する刺激応答型分離材料において、前記基材が多孔質体からなることを特徴とする刺激応答型分離材料。

(4) 刺激応答性高分子鎖よりなる領域と標的物質に対して親和性を有する領域とを基材表面に有する刺激応答型分離材料を用いて、標的物質を該分離材料に吸着させた後、該刺激応答性高分子鎖の高次構造を変化させることにより、標的物質を該分離材料より脱離させることを特徴とする物質の分離精製方法。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明においては、標的物質は特に限定されず、蛋白質、糖蛋白質、核酸、細胞、人工細胞、合成高分子化合物等を例示できる。本発明の分離材料は、刺激応答性高分子鎖と標的物質に対して親和性を有する領域よりなる領域とを基材表面に有する材料であり、特に表面状態は限定されないが、基材表面が相分離していることが好ましい。この時、標的物質に対して親和性を有する分子(リガンド)が、相分離構造に従ってミクロ的に不均一に存在するが、その際、標的物質の大きさが該標的物質に対して親和性を有する領域の大きさより小さいことが好ましい。相分離構造を基材表面に形成させる方法としては、刺激応答性高分子にブロック共重合体を用いる方法が好ましい。一般に、高分子間では相溶性を示すものもあるが、多くの高分子は相分離を起こすことが知られている。特に、ブロック共重合体は、海島状、縞状、ラメラ状に規則的なミクロ相分離構造を発現することが知られており、このような構造が本発明の分離材料として好ましい。

【0011】また、刺激応答性高分子の構造としては、グラフト共重合体、交互共重合体もしくはランダム共重合体でもかまわない。これらの共重合体は、分離する標的細胞の性質と共重合体の刺激応答による構造変化の大きさを考慮して選択するのが好ましい。基材表面における標的物質の親和性領域の比率は、外部環境により異なるため明確に規定できないが、標的物質を吸着する時に、10~90%、好ましくは、20~80%である。

【0012】標的物質としては、細胞を好適に例示できる。ここで、基材表面が相分離している場合、リガンドが、相分離構造に従ってミクロ的に不均一に存在しているため、細胞が分離材料表面に吸着されるときにしばし

ば観察されるキャッシング現象が回避されソフトに吸着することとなる。そのため、細胞の損傷が少なくなり、吸着した細胞の機能を発現させる場合や分離精製(回収)する場合に、優れた性能を発現することとなる。また、標的とする細胞は限定されず、例えば、上皮系細胞、肝実質細胞、脾ラ島細胞、マクロファージ、単核球、クッパー細胞、ラ島細胞、NK細胞(CD5⁺)、血小板、血液幹細胞等の未分化細胞(CD3⁺)、Bリンパ球、Tリンパ球、及びそのサブセット(CD4⁺、CD8⁺、CD19⁺、CD71⁺、IL2R⁺等)、各種の腫瘍細胞や機能細胞等より、目的に応じて選定される。

【0013】刺激応答性高分子としては、熱、pH、電位、光等により高次構造が変化して、水溶液中で膨潤したり収縮する高分子であればよい。例えば、水に対する上限臨界温度または下限臨界温度を有し、温度変化に応答して、膨潤・収縮する高分子を好適に例示できる。そのような高分子としては、N-イソプロピルアクリラミドやN,N-ジエチルアクリラミド、N-イソプロピルメタアクリラミドなどのアクリラミドやメタアクリラミドの誘導体類をはじめ、ビニルメチルエーテルなどのビニルエーテル類等のポリマーやコポリマーを例示できる。

【0014】また、光により構造変化させる場合は、例えば、アゾベンゼン基を有する吸水性高分子のように光異性化を起こす高分子、トリフェニルメタンロイコハイドロオキシドのビニル誘導体とアクリラミド系单量体との共重合体のように光イオン解離する感応基を有する光応答性高分子、スピロベンゾピランを含むN-イソプロピルアクリラミドゲルのように疎水性相互作用を光制御することにより一定温度領域で光により相転移を生じる光応答性高分子等を用いることができる。

【0015】電気化学的に構造変化を生じさせるには、ビニルフェロセンとN-イソプロピルアクリラミドとの共重合体のようにフェロセニル基を側鎖に有する電気応答性高分子を例示することができる。フェロセニル基は、還元状態では疎水性の官能基であるが、酸化されると親水性が高まるため、一定の温度領域で電気化学的に膨潤~収縮を制御することができる。

【0016】電気や光により制御できる温度領域は、前記したアルキルアクリラミドのような温度応答性高分子を形成するモノマーに親水性モノマーや疎水性モノマーを少量共重合させることにより、任意に制御することができる。例えば、疎水性モノマーを共重合させると相転移温度は低くなり、親水性モノマーを共重合させると相転移温度は高くなる。

【0017】イオンにより構造変化を誘導したり加速するためには、イオン解離する官能基を有するモノマーを共重合したり、イオンを捕捉する分子を側鎖に導入させてやればよい。例えば、ナトリウムやカリウムを認識す

るクラウンエーテル（ベンゾ[18]クラウン-6など）を側鎖に導入したポリN-イソプロピルアクリラミドは、ナトリウムイオンやカリウムイオンにより相転移が引き起こされる。

【0018】pHやイオン強度等の環境による高分子構造の変化も、細胞機能の損傷が激しくならない条件で使用することができる。pHやイオン強度による構造制御は、カルボキシル基を有するポリアクリル酸やポリメタクリル酸、スルホン酸基を有するポリビニル硫酸やポリスチレンスルホン酸、アミノ基を有するポリビニルアミンやポリビニルアリルアミンといったイオン解離基を有する高分子化合物について適用できる。この場合、静電相互作用による非特異的吸着が起こりやすいので注意しなければならない。

【0019】尚、上記技術を組み合わせることにより、複数の環境変化に応答する高分子を有する刺激応答型分離材料を作製することもできる。

【0020】標的物質に対して親和性を有する領域には、抗原-抗体、酵素-基質（阻害剤）、各種の生理活性物質とそのレセプターとの反応等の生体の制御機構で見られる特異的親和性により標的物質を吸着するリガンドや、静電相互作用、疎水性相互作用、水素結合、ファンデルワールス相互作用等によって標的物質に対して親和性を示す合成化合物やそれらの相互作用を効果的に発現できるよう人工的に設計された分子認識素子等が存在する。

【0021】標的物質に対して親和性を有する領域は、刺激応答性高分子鎖と必ずしも化学的に結合していないくともよく、ブレンド法や積層法を利用して相分離構造を形成させ、表面に結合されていればよい。また、金属、セラミック、あるいは有機物よりなる直径5μm以下、好ましくは2μm以下の微粉体などをを利用して不均一構造を形成させ、該微粉体上に標的物質に対して親和性を有する物質を結合させることも可能である。

【0022】標的物質に対して、親和性を有する領域と刺激応答性高分子鎖を化学的に結合させる方法としては、刺激応答性高分子鎖中に導入された反応性官能基を用いる方法が好ましい。この結合方法は、公知の化学反応を用いた方法で達成できるが、両者の結合の間に、スペーサーや2種以上の化合物よりなる結合が存在してもよい。結合様式としては、生理的条件で容易に脱離しないことが望ましいが、必ずしも共有結合である必要はなく、イオンコンプレックスや電荷移動錯体等を利用した結合でもかまわない。また、生理的条件で高い親和性を有するビオチン-アビジン、ビオチン-ストレプトアビジン、リボフラビン-リボフラビン結合蛋白、プロテインA-IgG、プロテインG-IgG等の生化学的親和性を利用した結合であってもよい。ビオチン-アビジンの組み合わせは、ビオチン標識抗体等が市販されており容易に入手できるため、標的物質に対する抗体をア

ビジンを介して反応性官能基に固定化することができる。

【0023】反応性官能基とは、標的物質に対して親和性を有するリガンドを結合できる官能基であれば良く、カルボキシル基、アルデヒド基、アミノ基、イミノ基、スルホン酸基、エポキシ基、イソシアネート基、酸クロリド基、ヒドロキシ基、チオール基、ジスルフィド基等の官能基を例示できる。また、カルボニルジイミダゾール、トシリ、トレシル等で活性化されていてもかまわない。これらの官能基を利用して、直接あるいは縮合剤や架橋剤を用いて、標的物質に対するリガンドを結合することが可能である。反応性官能基がエポキシ基のように、直接アミノ基やカルボキシル基と反応するタイプであると反応操作が簡略化できるため好ましい。ヒドロキシ基のように反応性の低い官能基の場合、両末端に反応性の高い官能基を有する架橋剤、例えばポリイソシアネート化合物、ポリエポキシ化合物、ジアルデヒド化合物などを利用してリガンドを固定化することも可能である。

【0024】反応性官能基を有する分子鎖を形成させる方法は、公知の方法でかまわない。例えば、反応性官能基を有する単量体を単独重合したり、他の単量体と共に重合することにより反応性官能基を有する分子鎖を形成させる方法や、すでに形成された分子鎖を化学修飾することにより反応性の高い官能基を導入する方法などを例示できる。

【0025】分離材料の基材は、特に限定されないが、多孔質膜、多孔質フィルター等の多孔質体が好ましく、無孔質体でもかまわない。さらに、その形状も特に限定されず、プレート状、シャーレ状、繊維状、不織布状、ビーズ状等を例示でき、それぞれの形状にあったカラムなりモジュールなどに収納されて使用されてもかまわない。

【0026】また、その基材となる材質についても水に対して非溶解性であれば特に限定されず、ポリオレフィン、ハロゲン化ポリオレフィン、ポリウレタン、ポリアミド、ポリエステル、綿、ポリスチレン、及びそれらの変性物や共重合体等、既存の材料を例示することができる。

【0027】本発明の刺激応答性分離材料の製造方法は、限定されず、

①基材表面に刺激応答性領域よりなる分子鎖と反応性官能基を有する分子鎖とを有するブロック共重合体、グラフト共重合体、交互共重合体もしくはランダム共重合体を主成分とする基材表面を形成させた後、標的物質に対して親和性を有する物質を該共重合体の反応性官能基に固定化させる方法。

②刺激応答性領域よりなる分子鎖と反応性官能基を有する分子鎖とを有するブロック共重合体、グラフト共重合体、交互共重合体もしくはランダム共重合体に、標的物

質に対して親和性を有する物質を該共重合体の反応性官能基に結合させた後、基材表面上に保持させる方法、
 ③刺激応答性領域よりなる分子鎖と反応性官能基を有する分子鎖とを有するブロック共重合体、グラフト共重合体、交互共重合体もしくはランダム共重合体と、標的物質に対して親和性を有する物質とを含む溶液を基材表面上に塗布した後、お互いを反応させる方法、等が挙げられる。

【0028】①～③の場合において、該共重合体もしくは親和性を有する物質の基材表面への導入方法は限定されず、基材の反応性官能基と化学結合させても、基材表面に含浸させるだけでもよい。さらに、グラフト共重合体の場合においては基材表面上に直接、刺激応答性モノマーと反応性官能基を有するモノマーをグラフト共重合してもよい。

【0029】また、基材への刺激応答性領域よりなる高分子鎖と反応性官能基を有する分子鎖とを有するブロック共重合体、グラフト共重合体、交互共重合体もしくはランダム共重合体の保持において、基材表面にあらかじめ反応性官能基を有するモノマーをグラフト重合させておいてもよい。さらに、基材への前記共重合体の保持において刺激応答性領域を有さないポリマーを第三成分として添加してもよい。この第三成分のポリマーとしては、リガンドを結合でき、または反応性官能基を有する分子鎖同士を結合できる官能基を持ったポリマーであれば特に限定されない。

【0030】分離材料に吸着した標的物質の回収は、温度、光、電気等の刺激により刺激応答性高分子の高次構造を急速に変化せしめることにより行う。例えば、刺激応答性領域が収縮した条件下でリガンドが表面に存在する分離材料の場合、この状態で標的物質を吸着させた後、外部刺激により刺激応答性領域を膨潤することにより、その急激な環境変化を利用して標的物質が材料表面より脱着することとなる。さらに、この回収方法にプロテアーゼ処理等の従来技術を併用しても、相乗効果により短時間での細胞回収が容易になる。

【0031】脱着させた場合の回収率は、固定化したリガンドの種類や状態、刺激応答領域と吸着領域の構造や組成比により異なり、使用条件に応じた条件設定が必要となるが、50%以上、好ましくは80%以上である。

【0032】標的物質と刺激応答性高分子の間に弱い結合が存在する場合、その結合を解離することによって標的物質を脱離させてもかまわない。回収率の向上などを目的として、必要に応じて物理的な方法や化学的な方法を併用してもかまわない。物理的な方法としては、攪拌等が挙げられ、化学的な方法としては加熱／冷却変化、pH変動、イオン強度変化等が挙げられる。

【0033】ここで、基材が多孔質膜の場合、平均孔径が0.01μm～1μmである微多孔質膜であるのが好ましく、さらには平均孔径が0.02μm～0.8μmの

ものであるのが好ましい。平均孔径は、パームポロメーターにより測定された平均孔径であり、原理はASTM-316に記載されている。細胞の大きさは一般に約数μm～数十μmのため、前記平均孔径の時、該微多孔質膜を通過することができず、多くの細胞は膜の表面もしくは表層部に捕捉されることとなる。平均孔径が1μmを越える場合や0.01μmより小さい場合は、細胞と基材表面との接触面積が大きくなり、該微多孔質膜を用いる効果が低くなる。さらに、該微多孔質膜を用いる時、その膜厚は、5μm～5000μm程度が好ましく、さらに好ましくは20μm～400μmである。ここで、5μm以下だと膜強度が弱くなり、5000μmを越えると体積が増加しモジュールが大きくなり過ぎる。また、その形状は、平膜状であっても中空糸・チューブ状であっても良い。

【0034】該微多孔質膜が非対象膜構造の場合、最表面の平均孔径が細胞より大きくなり、細胞を捕捉する活性層が膜内部に形成されることもありうる。好ましくは、膜の最表面で細胞を捕捉できる膜である。すなわち、白血球が貧食細胞により曲率の大きい纖維の表面に吸着している状態ではなく、微細孔を有する平面上に吸着されていることが望ましい。従って、該微多孔質膜は、網目状、スポンジ状、微粒子状、延伸法により多孔質化されたミクロフィブリル状の膜構造、微細纖維の集合体状を有することが好ましい。そのような多孔質膜の製造方法は、公知の相分離法により溶液や溶融状態から製膜された。

【0035】さらに、前記のような微多孔質膜の場合は、必ずしも刺激応答性高分子は必要でない。それは、該微多孔質膜の平均孔径が細胞より小さいため、細胞表面は、膜の実質部位と空孔部位とのミクロ的に不均一な表面上に捕捉されていることとなる。すなわち、細胞は、膜表面に結合されたりガンドとミクロ的に不均一に結合しているため、細胞が表面に吸着するときにしばしば観察されるキャッピング現象が回避され、ソフトに吸着することとなる。そのため、細胞の損傷が少なくなり、吸着した細胞の機能が良好に維持されることとなる。細胞吸着部位における実質部位と空孔部位との比率は、空孔部位が20～95%、好ましくは、40～90%である。

【0036】前記微多孔質膜を基材とした場合の細胞回収方法は、該微多孔質膜の一方の側より被処理液を流して標的細胞を吸着せしめた後、細胞回収液を反対側の面より流し、標的細胞を回収する。該微多孔質膜は、平均孔径が細胞の大きさより小さいため、該微多孔質膜を通過せず膜の表層部にトラップされている。そのため、細胞が脱着しやすい方向に圧力をかけることにより、効率良く細胞を回収することが可能となる。プロテアーゼ処理により基材表面から細胞を剥離させる場合、該微多孔質膜は、細胞培養用フラスコのような非多孔性表面と比

較して、基材表面との接着部位が少ないため基材表面から細胞を容易に剥離させることができ。ここで、該微多孔質膜を用いた場合の標的物質は細胞に限定されない。

【0037】また、前記微多孔質膜は、市販のフィルターホルダーや公知の形態のモジュールに組み込んで使用することが可能である。

【0038】

【実施例】

(実施例1) 標的物質としてCD4⁺細胞(MT-4)を設定し、標的物質に対して特異的親和性を有する物質として抗CD4抗体(Leu-3a)、刺激応答性高分子としてポリ(N,N-ジエチルアクリラミド)を用いて刺激応答性分離材料を作製し、CD4⁺細胞の分離を検討した。

【0039】主鎖にアゾ基を有するポリ(グリシジルメタクリレート)を重合開始剤として、N,N-ジエチルアクリラミドをジメチルスルホキシド(DMSO)中で80℃、16時間重合し、石油エーテル中で再沈殿させた後、ポリマーを減圧乾燥させることにより、刺激応答性ドメインとしてポリ(N,N-ジエチルアクリラミド)、反応性ドメインとしてポリ(グリシジルメタクリレート)を有するブロック共重合体(モル組成比3:1)を得た。

【0040】このブロック共重合体の3wt%ジオキサン溶液を、厚さ100μmのポリウレタンシートにコーティングした。続いて、0.01wt%のポリエチレンイミン(平均分子量1200)を含む抗CD4抗体の5mg/m1溶液をコーティングした後、38℃で16時間反応させることにより、刺激応答型分離材料を得た。

【0041】この材料に、人新鮮血バフィーコートより1%アルブミン添加リン酸バッファー(PBS)で洗浄して調整した白血球液(1×10⁶/m1)を37℃で接触させることにより、CD4⁺細胞を吸着させた。位相差顕微鏡を用いて、吸着細胞の脱着を観察したところ、1%アルブミンを添加したPBSで25℃でリーンすることにより脱着できることを確認した。

【0042】(実施例2) 1.0wt%のポリメタクリル酸を溶解させたDMSO溶液と、実施例1で作製したブロック共重合体の4wt%DMSO溶液を1:1で混合した後、ポリメタクリル酸を表面グラフト重合したポリエチレンシートにコーティングした後、60℃、40時間反応させた。続いて、5mg/m1の1-エチル-3-(ジメチルアミノ)プロピルカルボジイミド(シグマ社製)溶液20ml(pH5.5)をシャーレに注入し、5分間室温で浸漬させた。続いて、抗CD4抗体(Leu-3a)の5mg/m1溶液と接触させて室温で1時間毎々搅拌しながら反応させた後、グリシンを最終濃度で0.2モルとなるように添加して1時間放置した後、PBSでリーンすることにより刺激応答型分離材料を作

製した。

【0043】この材料に、人新鮮血バフィーコートより1%アルブミン添加PBSで洗浄して調整した白血球液(1×10⁶/m1)を37℃で接触させることにより、CD4⁺細胞(MT-4)を吸着させた。位相差顕微鏡を用いて、吸着細胞の脱着を観察したところ、1%アルブミンを添加したPBSで25℃でリーンすることにより脱着できることを確認した。

【0044】(実施例3) 主鎖にパーオキサイド基を有するグリシジルメタクリレートとメチルアクリレートとの共重合体(モル組成比1:1)を重合開始剤として、N-イソプロピルアクリラミドをDMSO中で80℃、16時間重合して、刺激応答性ドメインとしてポリ(N-イソプロピルアクリラミド)、反応性ドメインとしてポリ(グリシジルメタクリレート-メチルアクリレート共重合体)を有するブロック共重合体(モル組成比4.8:1)を得た。

【0045】0.5wt%の抗CD4抗体(Leu-3a)を含む20%DMSO溶液に上記ブロック共重合体2wt%を含む60%DMSO溶液を1:1で混合した後、ポリメタクリル酸を表面グラフト重合したポリエチレンシートにコーティングし、60℃、40時間反応させた。

【0046】この材料に、人新鮮血バフィーコートより1%アルブミン添加PBSで洗浄して調整した白血球液(1×10⁶/m1)を37℃で接触させることにより、CD4⁺細胞(MT-4)を吸着させた。位相差顕微鏡を用いて、吸着細胞の脱着を観察したところ、1%アルブミンを添加したPBSで25℃でリーンすることにより脱着できることを確認した。

【0047】(実施例4、比較例1) 標的細胞としてCD4⁺細胞(MT-4)、標的細胞に対して特異的親和性を有する物質として抗CD4抗体(Leu-3a)、微多孔質膜としてポリプロピレンを主成分とする微多孔質膜(平均孔径0.14μm、膜厚80μm、表面網目状)を用いて実験を行った。又、比較例1として、未延伸ポリプロピレンフィルム(膜厚60μm)を用いて同様に実験を行った。

【0048】主鎖にアゾ基を有するポリ(グリシジルメタクリレート)を重合開始剤として、メトキシエチルアクリレートをDMSO中で80℃、16時間重合し、イソプロピルエーテル中で再沈殿させた後、ポリマーを減圧乾燥させることにより、メトキシエチルアクリレートとグリシジルメタクリレートのブロック共重合体(モル組成比4.5:1)を得た。

【0049】このブロック共重合体の2wt%テトラヒドロフラン溶液を、ポリプロピレン製微多孔質膜にコーティングした。続いて、0.5wt%のポリエチレンイミン(平均分子量1200)のメタノール/水(1:1)溶液をコーティングした後、60℃で16時間反応させる

ことにより、基材表面にポリエチレンイミンを結合した微多孔質膜を得た。続いて、 $20\text{ mg}/\text{m l}$ の1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(シグマ社製)溶液 20 m l (pH 4.5)をシャーレに注入し、3時間室温で浸漬させた。続いて、抗CD4抗体の $50\text{ }\mu\text{g}/\text{m l}$ 溶液と接触させて 4°C で16時間時々攪拌しながら反応させた後、PBSで洗浄した。

【0050】本材料及び比較例1のフィルムに、人新鮮血バフィーコートより1%アルブミン添加PBSで洗浄して調整した白血球液($1\times 10^6/\text{m l}$)を 37°C で接触させて、CD4⁺細胞を吸着させた。細胞の脱着は、EDTA/トリプシン溶液を加えた後、位相差顕微鏡で観察した。微多孔質膜のほうがフィルムと比較して、細胞の脱着が速かった。

【0051】(実施例5、比較例2)標的細胞としてCD4⁺細胞(MT-4)、標的細胞に対して特異的親和性を有する物質として抗CD4抗体(Leu-3a)、微多孔質膜としてポリビニリデンフルオライドを主成分とする微多孔質膜(平均孔径 $0.47\text{ }\mu\text{m}$ 、膜厚 $80\text{ }\mu\text{m}$ 、表面スポンジ状)を用いて実験を行った。又、比較例2として、ポリビニリデンフルオライドフィルム(膜厚 $60\text{ }\mu\text{m}$)を用いて同様に実験を行った。

【0052】主鎖にパーオキサイド基を有するポリ(グリシジルメタクリレート)を重合開始剤として、N-イソプロピルアクリルアミドをDMSO中で 80°C 、16時間重合し、イソプロピルエーテル中で再沈殿させた後、ポリマーを減圧乾燥させることにより、刺激応答型ドメインとしてポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)、反応性ドメインとしてポリ(グリシジルメタクリレート)を有するブロック共重合体(モル組成比3.2:1)を得た。

【0053】このブロック共重合体の2wt%テトラヒドロフラン溶液を、ポリビニリデンフルオライド製微多孔質膜にコーティングした。続いて、0.5wt%のポリエチレンイミン(平均分子量1200)のメタノール/水(1:1)溶液をコーティングした後、 60°C で16時間反応させることにより、表面にポリエチレンイミンを結合した刺激応答型分離材料を得た。続いて、 $20\text{ mg}/\text{m l}$ の1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(シグマ社製)溶液を 20 m l (pH 5.5)シャーレに注入し、4時間室温で浸漬させた。続いて、抗CD4抗体の $50\text{ }\mu\text{g}/\text{m l}$ 溶液と接触させて 4°C で16時間時々攪拌しながら反応させた後、PBSでリーンスした。

【0054】CD4⁺細胞をPRM11640培地で $1\times 10^6/\text{m l}$ に調製した後、 37°C で試料と接触させることにより、CD4⁺細胞を吸着させた。 4°C に冷却したPBSを添加した後、位相差顕微鏡で観察したところ、微多孔質膜では吸着細胞が脱着していたが、フィルムでは部分的に脱着していない細胞が観察された。

【0055】(実施例6、比較例3)基材として、ポリウレタン製フィルター(膜厚 $150\text{ }\mu\text{m}$ 、平均孔径 $0.6\text{ }\mu\text{m}$ および $1.4\text{ }\mu\text{m}$ 、表面スポンジ状)を用いて、標的細胞としてCD4⁺細胞(MT-4)、標的細胞に対して特異的親和性を有する物質として抗CD4抗体(Leu-3a)を用いて、実施例5と同様に実験を行った。また、比較例3として無孔性のポリウレタンフィルムを用いて同様に実験を行った。

【0056】脱離回収した細胞数を比較したところ、平均孔径が $0.6\text{ }\mu\text{m}$ のウレタンフィルターが51000個、平均孔径が $1.4\text{ }\mu\text{m}$ のウレタンフィルターが26000個、ウレタンフィルムでは22000個であり、微多孔質膜の優位性が確認された。

【0057】(実施例7)実施例5の膜を、平膜用モジュール(有効膜面積 24 cm^2)を用いて評価した。該モジュールは、膜で隔たれた2つの空間を有し、一方の空間に液体流入口と液体出口があり、もう一方の空間に回収液の流入口がある。

【0058】CD4⁺細胞をPRM11640培地で $1\times 10^5/\text{m l}$ に調製した後、 37°C で $2\text{ m l}/\text{min}$ の流速で 100 m l 、液体流入口から液体出口へ流した。細胞の回収は、モジュールを 4°C に冷却後、 4°C に冷却したPBSを膜の細胞吸着面と反対側より $2\text{ m l}/\text{min}$ の流速で 20 m l 流し、液体出口から収集した。細胞回収率は、63%であった。

【0059】

【発明の効果】本発明の分離材料は、刺激応答性領域と標的物質に対する親和性領域とが存在する。従って、刺激応答性領域における体積変化が大きくなり吸着物質の脱着が起りやすくなる。また、基材表面に相分離構造を形成させることにより、標的細胞が吸着した場合のキャッピング現象を抑制することができるため、機能損傷の少ない高品質の細胞を回収できることとなる。

【0060】さらに、本発明の刺激応答型分離材料の基材の平均孔径を限定した微多孔質膜で平均孔径が標的物質より小さい時、標的物質は微多孔質膜の実質部位と空孔部位とのミクロ的に不均一な表面上に捕捉されていることとなり、キャッピング現象が回避され、ソフトに吸着することとなる。そのため、細胞の損傷が少なくなり、吸着した細胞の機能が良好に維持されることとなる。さらには、非多孔性表面と比較して基材との接着部位が少ないため、基材から細胞を脱着することが容易となる。

【0061】また、微多孔質膜の時の細胞回収方法は、膜の一方の側より被処理液を流して標的細胞を吸着せめた後、細胞回収液を反対側の面より流すことにより標的細胞が、微多孔質膜を通過せず、膜の表層部にトラップされているため、細胞が脱着しやすい方向に圧力がかかることにより、効率よく細胞を回収することが可能になる。

13

【0062】その結果、従来困難であった血球系細胞や機能細胞の分離精製が簡便にできるようになり、本発明の分離材料や技術は、標的細胞の分離、増殖、機能変換等を利用したバイオプロダクツの生産や細胞治療、遺伝*

14

*子治療、診断等に効果を發揮することとなる。また、本発明は、医療分野のみならず各種の産業分野において新しい分離技術として効果を発現することとなる。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.6	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
// B 0 1 D 61/14	5 0 0		B 0 1 D 61/14	5 0 0
C 1 2 M 1/00			C 1 2 M 1/00	A

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-049830
(43)Date of publication of application : 18.02.1997

(51)Int.Cl. G01N 30/88
B01D 15/08
B01J 20/26
G01N 30/48
G01N 33/543
// B01D 61/14
C12M 1/00

(21)Application number : 07-203378

(71)Applicant : TERUMO CORP

(22)Date of filing : 09.08.1995

(72)Inventor : ONISHI MASATO
MOTOMURA TADAHIRO

(54) STIMULUS RESPONDING TYPE SEPARATING MATERIAL AND SEPARATING AND REFINING METHOD

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a separating material which has a high specificity to a target material and can easily recover the target material by forming a domain composed of stimulus responding high molecular chains and another domain having an affinity to the target material on the surface of a base material and a separating system.

SOLUTION: A separating material has a domain composed of stimulus responding high molecular chains and another domain having an affinity to a target material on the surface of its base material. The stimulus responding type high molecule can be a graft copolymer, a alternating copolymer, or a random copolymer. It is preferable to select a suitable copolymer out of the copolymers by taking the nature of a target cell to be separated and the magnitude of the structural change of the copolymer caused by the stimulus response into consideration. The most suitable target material is a cell. When phase separation occurs on the surface of the base material, the capping phenomenon which is often observed when cells are adsorbed to the surface of a separating material is avoided and the cells are softly adsorbed to the surface, because ligands unevenly exist when viewed microscopically in accordance the phase separating structure.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C) 1998,2000 Japan Patent Office

* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] Stimulus response type separation material characterized by having the field which consists of a stimulus responsibility macromolecule chain, and the field which has compatibility to the target matter on a base-material front face.

[Claim 2] Stimulus response type separation material according to claim 1 characterized by having the copolymer which has the chain which consists of a stimulus responsibility field, and the chain which has compatibility to the target matter on a base-material front face.

[Claim 3] Stimulus response type separation material to which the aforementioned base material is characterized by the bird clapper from a porosity object in the stimulus response type separation material which has the field which consists of a stimulus responsibility macromolecule chain, and the field which has compatibility to the target matter on a base-material front face.

[Claim 4] The separation refining method of the matter characterized by desorbing the target matter from this separation material by changing the higher order structure of this stimulus responsibility macromolecule chain after making the target matter stick to this separation material using the stimulus response type separation material which has the field which consists of a stimulus responsibility macromolecule chain, and the field which has compatibility to the target matter on a base-material front face.

[Translation done.]

* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[The technical field to which invention belongs] this invention relates to a new separation material using the matter which has specific compatibility to the target matter, and the stimulus responsibility macromolecule, its manufacture method, and the separation method.

[0002]

[Description of the Prior Art] In recent years, the research using the cell or the gene of a cell therapy or gene therapy prospers with development of a cell technology, genetic engineering, etc., and the technology separated without damaging the cell and biological substance which were made into the purpose is important. Moreover, production of physiological activity molecules, such as a peptide by the bionics-technique, protein, and glycoprotein, is performed by development of biotechnology, a cell and bioproducts are simple and recovery and purification with few injuries are desired.

[0003] In the unit operation of separation and refining, such as adsorption, distribution, distillation, and a deposit currently conventionally used in the chemical-industry field, in order to force it a large environmental variation to the refined matter, it is suitable for neither the above-mentioned cell nor separation of bioproducts in many cases with addition of heat or an organic solvent etc.

[0004] The methods according to volume (molecular weight) or density as the separation method of a cell or bioproducts (sedimentation velocity method, density gradient centrifugation, gel filtration technique, etc.). The methods (electrophoresis etc.) by the difference of the mobility in the inside of electric field, the method by the isoelectric point, the method (the two-layer distributing method, partition chromatography) by distribution of a between [2 liquid phase (electrofocusing etc.)], the method (an adsorption chromatography, affinity chromatography) by the difference of the adsorptivity to solid phase, etc. are learned.

[0005] many of these separation methods are physicochemical — physicochemical, although a character can apply to separation of a greatly different cell component — application was difficult for separation of the component which the character resembled well, or a cell, for example, a lymphocyte subset In this, the method for the target matter that selectivity is high is affinity chromatography, and is used increasingly widely in recent years. The separation method using the bead and petri dish which combined the monoclonal antibody to the membrane protein which exists in the surface of a target cell as affinity chromatography for a cell is reported, and subset separation of the various lymphocytes by this method is also reported (for example, Journal of Immunological Method, No. 54, 251 pages, Brown's and others research report indicated in 1983). Although it was an advantage that the method using this antibody has very high singularity, it being necessary to lengthen time (contact time) for the desorption of the cell to which it stuck being difficult as a fault, and an antibody combining with the antigen of a cortex, consequently un-unique adsorption might increase.

[0006] The method of making it stick to separation material for a short time is proposed by WO 91/16116 using a high combination of compatibility like an avidin-biotin as a method which improved the above-mentioned fault. That is, after combining with a target cell beforehand the antibody which carried out the indicator over many hours by the biotin, a target cell can be efficiently separated by making it stick to the separation material which combined the avidin in a short time. However, by this method, since recovery of a target cell is performed by dissociating combination of an antibody and a target cell, and combination with an avidin and a biotin using physical vibration, the injury or depression of a cell by the collision of beads etc. do not escape.

[0007] The cell culture base material which covered the front face with the polymer or the copolymer which has the upper limit or minimum critical solution temperature to the water indicated by JP,2-211865,A in 0-80 degrees C as a method of collecting so that a cell function may not be spoiled is reported. This method is the method of carrying out the desorption of the cell to which it stuck when used the temperature responsibility macromolecule which carries out phase transition to a hydrophobic-property-hydrophilic property with temperature, changing temperature after making a cell adsorb in the state where the temperature responsibility macromolecule was hydrophobic and contracted, becoming a hydrophilic property and swelling. The fault of this method is that the singularity over a cell cannot collect specific cells from the liquid with which various cells exist for a low reason. Sticking to the front face where curvature is small was known, and especially many, such as a macrophage, a leucocyte, and a lymphocyte, were impossible for collecting specific lymphocytes etc. alternatively using this separation material that processed the filter and the nonwoven fabric configuration.

[0008]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Therefore, this invention has the high singularity over the target matter, and aims at offering the separation material and the separation system which can collect target matter simple.

[0009]

[Means for Solving the Problem] The purpose of the above-mentioned invention is attained by the following stimulus response type separation material and its manufacture method.

(1) Stimulus response type separation material characterized by having the field which consists of a stimulus responsibility macromolecule chain, and the field which has compatibility to the target matter on a base-material front face.

(2) Stimulus response type separation material given in (1) characterized by having the copolymer which has the chain which consists of a stimulus responsibility field, and the chain which has compatibility to the target matter on a

base-material front face.

(3) Stimulus response type separation material to which the aforementioned base material is characterized by the bird clapper from a porosity object in the stimulus response type separation material which has the field which consists of a stimulus responsibility macromolecule chain, and the field which has compatibility to the target matter on a base-material front face.

(4) The separation refining method of the matter characterized by desorbing the target matter from this separation material by changing the higher order structure of this stimulus responsibility macromolecule chain after making the target matter stick to this separation material using the stimulus response type separation material which has the field which consists of a stimulus responsibility macromolecule chain, and the field which has compatibility to the target matter on a base-material front face.

[0010]

[Embodiments of the Invention] In this invention, especially the target matter is not limited but can illustrate protein, glycoprotein, a nucleic acid, a cell, an artificial cell, a synthetic high polymer, etc. Although the separation material of this invention is a material which has the field which consists of a field which has compatibility to a stimulus responsibility macromolecule chain and the target matter on a base-material front face and especially a surface state is not limited, it is desirable that the base-material front face is carrying out phase separation. Although the molecule (ligand) which has compatibility to the target matter exists unevenly in micro according to phase separation structure at this time, it is desirable in that case that the size of the target matter is smaller than the size of the field which has compatibility to this target matter. As a method of making phase separation structure forming in a base-material front face, the method of using a block copolymer for a stimulus responsibility macromolecule is desirable. Although there are generally some which show compatibility between macromolecules, it is known that many macromolecules will start phase separation. Discovering micro phase separation structure regular the shape of the shape of **** and stripes and in the shape of a lamellae is known, and especially a block copolymer has such desirable structure as a separation material of this invention.

[0011] Moreover, as structure of a stimulus responsibility macromolecule, a graft copolymer, an alternating copolymer, or a random copolymer is sufficient. As for these copolymers, it is desirable to choose in consideration of the property of the target cell to separate and the size of the structural change by the stimulus response of a copolymer. Although it cannot specify clearly since it changes with external environments, the ratio of the compatibility field of the target matter in a base-material front face is 20 – 80% preferably 10 to 90%, when adsorbing the target matter.

[0012] As target matter, a cell can be illustrated suitably. Here, since the ligand exists unevenly in micro according to phase separation structure when the base-material front face is carrying out phase separation, the capping phenomenon by which a cell is often observed when a separation material-list side is adsorbed will be avoided, and it will adsorb soft. Therefore, the injury on a cell decreases, and the outstanding performance will be discovered, when making the function of a cell in which it adsorbed discover, or when carrying out separation refining (recovery). The cell made into a target is not limited. Moreover, for example, an epithelium system cell, a hepatocyte, The pancreas RA islet cell, a macrophage, a monocyte, Kupffer cell, the RA islet cell, a spontaneous killer cell (CD56+), According to the purpose, it is selected from undifferentiated cells (CD34+), such as a platelet and a blood stem cell, a B lymphocyte, a T lymphocyte and its subset, various kinds of tumor cells (CD4+, CD8+, CD19+, CD71+, IL2R+, etc.), a functional cell, etc.

[0013] What is necessary is just the macromolecule which higher order structure changes with heat, pH, potential, light, etc., and swells in solution or is contracted as a stimulus responsibility macromolecule. For example, it has the upper limit critical temperature or minimum critical temperature to water, a temperature change is answered, and it swells. – The macromolecule to contract can be illustrated suitably. As such a macromolecule, the derivatives of acrylamides, such as N-isopropyl acrylamide, N and N-diethyl acrylamide, and an N-isopropyl meta-acrylamide, or a meta-acrylamide are begun, and polymer and copolymers, such as a vinyl methyl ether, can be illustrated. [, such as vinyl ether,]

[0014] Moreover, when making it change structurally by light, the macromolecule which starts photoisomerization like the water absorbing polymer which has an azobenzene machine, the photo-responsive polymer which has the induction machine which carries out optical ionic dissociation like the copolymer of the vinyl derivative of a triphenylmethane-color leuco hydro oxide and an acrylamide system monomer, the photo-responsive polymer which produces phase transition by light in a constant-temperature field by carrying out optical control of the hydrophobic interaction like N-isopropyl acrylamide gel containing spirobenzopyran can be used.

[0015] In order to produce a structural change electrochemically, the electric responsibility macromolecule which has a ferro SENIRU machine in a side chain like the copolymer of a vinyl ferrocene and N-isopropyl acrylamide can be illustrated. Although a ferro SENIRU machine is a hydrophobic functional group, since a hydrophilic property will increase if it oxidizes, it can control swelling – contraction by reduced condition electrochemically in a fixed temperature field.

[0016] A temperature field controllable by the electrical and electric equipment or light can be arbitrarily controlled by carrying out little copolymerization of a hydrophilic monomer or the hydrophobic monomer to the monomer which forms a temperature responsibility macromolecule like said alkyl acrylamide. For example, if copolymerization of the hydrophobic monomer is carried out, a phase transition temperature will become low, and if copolymerization of the hydrophilic monomer is carried out, a phase transition temperature will become high.

[0017] What is necessary is to copolymerize the monomer which has the functional group which carries out ionic dissociation, or just to make the molecule which catches ion introduce into a side chain, in order to guide a structural change by ion or to accelerate. For example, as for the poly N-isopropyl acrylamide which introduced into the side chain the crown ethers (BENZO [18] crown -6 etc.) which recognize sodium and a potassium, phase transition is caused by sodium ion and potassium ion.

[0018] Change of the macromolecule structure by environment, such as pH and ionic strength, can also be used on the conditions to which damage on a cell function does not become intense. The structure control by pH or ionic strength is applicable about the high molecular compound which has an ionic dissociation machine called the polyvinyl amine and polyvinyl allylamine which have the polyacrylic acid which has a carboxyl group, a polymethacrylic acid, the polyvinyl sulphate which has a sulfonic group and polystyrene sulfonate, and an amino group. In this case, since the nonspecific adsorption by the electrostatic interaction tends to happen, it must be careful.

[0019] in addition, the stimulus response type separation material which has the macromolecule which answers

especially more two or more environmental variations which combine the above-mentioned technology is also producible

[0020] The molecular-recognition element artificially designed so that the synthetic compounds which show compatibility to the target matter by the ligand which adsorbs the target matter by the specific compatibility seen with the controlling mechanism of living bodies, such as a reaction of an antigen-antibody, an enzyme-substrate (inhibitor), various kinds of physiological active substances, and its receptor, an electrostatic interaction, a hydrophobic interaction, hydrogen bond, a van der Waals interaction, etc., and those interactions could be discovered effectively exists in the field which has compatibility to the target matter.

[0021] It does not necessarily need to combine with a stimulus responsibility macromolecule chain chemically, and the field which has compatibility to the target matter makes phase separation structure form using the blending method or a laminated layers method, and should just be combined with the front face. Moreover, it is also possible to combine the matter which is made to form uneven structure preferably using a pulverized coal 2 micrometers or less etc., and has compatibility to the target matter on this pulverized coal the diameter of 5 micrometers or less which consists of a metal, a ceramic, or the organic substance.

[0022] As a method of combining chemically the field and stimulus responsibility macromolecule chain which have compatibility to the target matter, the method using the reactant functional group introduced into the stimulus responsibility macromolecule chain is desirable. Although this joint method can be attained by the method using the well-known chemical reaction, combination which consists of a spacer or two or more sorts of compounds may exist between both combination. Although it is desirable not to *** easily on physiological conditions as a joint format, it is not necessary to be necessarily covalent bond, and combination using ion complex, the electron donor acceptor complex, etc. is sufficient. Moreover, you may be combination using biochemical compatibility, such as a biotin-avidin which has high compatibility on physiological conditions, biotin-streptoavidin, riboflavin-riboflavin joint protein, protein A-IgG, and protein G-IgG. Since the biotin labelled antibody etc. is marketed and the combination of a biotin-avidin can come to hand easily, it can fix the antibody to the target matter in a reactant functional group through an avidin.

[0023] Functional groups, such as a carboxyl group, an aldehyde group, the amino group, an imino group, a sulfonic group, an epoxy group, an isocyanate machine, an acid-chloride machine, a hydroxy group, a thiol group, and a disulfide machine, can be illustrated that a reactant functional group should just be a functional group which can combine the ligand which has compatibility to the target matter. Moreover, it may be activated by carbonyldiimidazole, the tosyl, tresyl, etc. It is possible to combine the ligand to the target matter using direct or a condensing agent, or a cross linking agent using these functional groups. Since a reactant functional group can simplify reaction operation like an epoxy group as they are the direct amino group, a carboxyl group, and the type that reacts, it is desirable. In the case of a reactant low functional group, it is also possible like a hydroxy group to fix a ligand in both ends using the cross linking agent which has a reactant high functional group, for example, the poly isocyanate compound, the poly epoxy compound, a dialdehyde compound, etc.

[0024] A well-known method is sufficient as the method of making the chain which has a reactant functional group form. For example, the method of making the chain which has a reactant functional group forming, the method of introducing a reactant high functional group by carrying out chemical modification of the already formed chain, etc. can be illustrated by homopolymerizing the monomer which has a reactant functional group, or copolymerizing with other monomers.

[0025] Although especially the base material of separation material is not limited, its porosity objects, such as a porous membrane and a porosity filter, may be desirable, and nonporous *** is sufficient as it. Furthermore, especially the configuration is not limited, either but the shape of the shape of the shape of a plate and a petri dish, fibrous, nonwoven blanket-like one, and a bead etc. can be illustrated, and it may be used by the module etc., being contained in the column which suited each configuration.

[0026] Moreover, about the quality of the material used as the base material, especially if it is undissolved to water, it will not be limited, either, but a polyolefine, a halogenation polyolefine, polyurethane, a polyamide, polyester, cotton, polystyrene, those denaturation objects, copolymers, etc. can illustrate the existing material.

[0027] The block copolymer which has the chain which the manufacture method of the stimulus responsibility separation material of this invention is not limited, but becomes ** base-material front face from a stimulus responsibility field, and the chain which has a reactant functional group, After making the base-material front face which makes a principal component a graft copolymer, an alternating copolymer, or a random copolymer form, How to make the reactant functional group of this copolymer fix the matter which has compatibility to the target matter, ** The block copolymer which has the chain which consists of a stimulus responsibility field, and the chain which has a reactant functional group, After combining with the reactant functional group of this copolymer the matter which has compatibility to the target matter in a graft copolymer, an alternating copolymer, or a random copolymer, The block copolymer which has the method of making it hold on a base-material front face, and the chain which consists of a ** stimulus responsibility field and the chain which has a reactant functional group, a graft copolymer, an alternating copolymer, or a random copolymer, After applying the solution containing the matter which has compatibility to the target matter on a base-material front face, the method to which each is made to react is mentioned.

[0028] ** Even if the introductory method on the front face of a base material of the matter which has this copolymer or compatibility in --** is not limited but carries out a chemical bond to the reactant functional group of a base material, it is good to also make it sink into a base-material front face. Furthermore, you may carry out the graft copolymerization of the monomer which has a stimulus responsibility monomer and a reactant functional group directly on a base-material front face in the case of a graft copolymer.

[0029] Moreover, in maintenance of the block copolymer which has the macromolecule chain which consists of a stimulus responsibility field to a base material, and the chain which has a reactant functional group, a graft copolymer, an alternating copolymer, or a random copolymer, you may carry out the graft polymerization of the monomer which has a reactant functional group beforehand on a base-material front face. Furthermore, you may add the polymer which does not have a stimulus responsibility field in maintenance of the aforementioned copolymer to a base material as the third component. It will not be limited especially if it is polymer with the functional group which can combine the chains which can combine a ligand or have a reactant functional group as polymer of this third component.

[0030] Recovery of the target matter which stuck to separation material is performed by making the higher order structure of a stimulus responsibility macromolecule change with stimuli of temperature, light, the electrical and electric equipment, etc. quickly. For example, after making the target matter adsorb in this state in the case of the

separation material to which a ligand exists in a front face under the conditions which the stimulus responsibility field contracted, the target matter will carry out desorption from a material-list side by making a stimulus responsibility field swell by external stimulus using the rapid environmental variation. Furthermore, even if it uses the conventional technology, such as protease processing, together to this recovery method, cell recovery in a short time becomes easy according to the synergistic effect.

[0031] The recovery at the time of carrying out desorption is 80% or more preferably 50% or more, although it changes with the structures and the composition ratios of the kind and state of a ligand, a stimulus response field, and an adsorption field which were fixed and the conditioning according to the service condition is needed.

[0032] When weak coupling exists between the target matter and a stimulus responsibility macromolecule, you may desorb the target matter by dissociating the combination. You may use a physical method and a chemical method together if needed for the purpose of improvement in recovery etc. As a physical method, churning etc. is mentioned and heating/cooling change, pH change, ionic strength change, etc. are mentioned as a chemical method.

[0033] Here, when a base material is a porous membrane, it is desirable that it is the fine porous membrane whose average aperture is 0.01 micrometers – 1 micrometer, and it is desirable that it is that whose average aperture is 0.02 micrometers – 0.8 micrometers further. An average aperture is an average aperture measured by the palm porometer, and the principle is indicated by ASTM-316. Generally the size of a cell cannot pass this fine porous membrane at the time of the aforementioned average aperture because of divisor mum – 10 micrometers of numbers, but many cells will be caught by a membranous front face or the membranous surface section. When an average aperture exceeds 1 micrometer, or when smaller than 0.01 micrometers, the touch area on a cell and the front face of a base material becomes large, and the effect using this fine porous membrane becomes low. Furthermore, when using this fine porous membrane, 5 micrometers – about 5000 micrometers are desirable still more desirable, and the thickness is 20 micrometers – 400 micrometers. Here, if it is 5 micrometers or less, film intensity will become weak, if 5000 micrometers is exceeded, volume will increase and a module will become large too much. Moreover, even if the configuration is a flat film-like, it may have the shape of a hollow filament and a tube.

[0034] When this fine porous membrane is a membrane structure for un-, the barrier layer to which the average aperture on the front face of the maximum becomes larger than a cell, and catches a cell may be formed in the interior of a film. Preferably, it is the film which can catch a cell on the membranous maximum front face. That is, it is desirable to adsorb not on the state where the leucocyte is sticking to the front face of fiber with large curvature by the phagocyte but on the flat surface which has a micropore. Therefore, as for this fine porous membrane, it is desirable to have the shape of the membrane structure of the shape of the shape of a mesh and sponge and a particle and the shape of a microfibril which were porosity-ized by the extending method, and the aggregate of a microfilament. Such a manufacture method of a porous membrane was produced from the solution or the melting state by the well-known phase separation method.

[0035] Furthermore, in the case of the above fine porous membranes, a stimulus responsibility macromolecule is not necessarily required. Since it has the average aperture of this fine porous membrane smaller than a cell, cell surface will be caught on the front face of a membranous real part and a hole part uneven in micro. That is, since it has combined with the ligand combined with the film front face unevenly in micro, when a cell sticks to a front face, the capping phenomenon often observed will be avoided, and it will stick to a cell soft. Therefore, the injury on a cell will decrease and the function of a cell in which it adsorbed will be maintained good. The hole part of the ratio of the real part and hole part in a cell adsorption site is 40 – 90% preferably 20 to 95%.

[0036] After the cell recovery method at the time of making the aforementioned fine porous membrane into a base material passes a processed liquid and makes a target cell adsorb from one of this fine porous-membrane side, it pours cell recovery liquid from the field of an opposite side, and collects target cells. Since this fine porous membrane has the average aperture smaller than the size of a cell, it does not pass this fine porous membrane, but the trap is carried out to the membranous surface section. Therefore, when a cell puts a pressure in the direction of a desorption plain-gauze cone, it becomes possible to collect cells efficiently. When making a cell exfoliate from a base-material front face by protease processing, since there are few cohesive sites on the front face of a base material, as for this fine porous membrane, as compared with a non-porosity front face like the flask for cell cultures, it is possible to make a cell exfoliate easily from a base-material front face. Here, the target matter at the time of using this fine porous membrane is not limited to a cell.

[0037] Moreover, the aforementioned fine porous membrane can be used, including in a commercial filter electrode holder or the module of a well-known gestalt.

[0038]

[Example]

(Example 1) The CD4+ cell (MT-4) was set up as target matter, stimulus responsibility separation material was produced as matter which has specific compatibility to the target matter, using poly (N and N-diethyl acrylamide) as anti-CD4 antibody (Leu-3a) and a stimulus responsibility macromolecule, and separation of a CD4+ cell was considered.

[0039] Let poly (glycidyl methacrylate) which has an azo machine in a principal chain be a polymerization initiator. After carrying out the polymerization of the 80 degrees C of the N and N-diethyl acrylamides in dimethyl sulfoxide (DMSO) for 16 hours and making them reprecipitate in the petroleum ether, the block copolymer (mol composition ratio 3:1) which has poly (glycidyl methacrylate) as poly (N and N-diethyl acrylamide) and a reactant domain as a stimulus responsibility domain was obtained by carrying out reduced pressure drying of the polymer.

[0040] The polyurethane sheet with a thickness of 100 micrometers was coated with the 3wt% dioxane solution of this block copolymer. Then, after coating 5mg [/ml] solution of anti-CD4 antibody containing 0.01wt% polyethyleneimine (average molecular weight 1200), stimulus response type separation material was obtained by making it react at 38 degrees C for 16 hours.

[0041] The CD4+ cell was made to adsorb by contacting the leucocyte liquid (1×10^6 / ml) which washed into this material with the albumin addition phosphoric-acid buffer (PBS) 1%, and was adjusted to it from the man fresh-blood buffy coat at 37 degrees C. When the desorption of an adsorption cell was observed using the phase-contrast microscope, it checked that desorption could be carried out by carrying out a rinse at 25 degrees C by PBS which added albumin 1%.

[0042] (Example 2) After coating on the polyethylene sheet which carried out the surface graft polymerization of the polymethacrylic acid after mixing the DMSO solution in which the 1.0wt% polymethacrylic acid was dissolved, and the

4wt%DMSO solution of the block copolymer produced in the example 1 by 1:1, 60 degrees C was made to react for 40 hours. Then, you poured 20ml (pH 5.5) of 5mg [/ml] 1-ethyl-3-(dimethylamino propyl) carbodiimide (sigma company make) solutions into the petri dish, and made it immersed at a room temperature for 5 minutes. Then, after having added the glycine so that it might become 0.2 mols by the last concentration after making it react, having made 5mg [/ml] solution of anti-CD4 antibody (Leu-3a) contact, and sometimes agitating at a room temperature for 1 hour, and leaving it for 1 hour, stimulus response type separation material was produced by carrying out a rinse by PBS.

[0043] The CD4+ cell (MT-4) was made to adsorb by contacting the leucocyte liquid (1x106-/ml) which washed into this material by the albumin addition PBS 1%, and was adjusted to it from the man fresh-blood buffy coat at 37 degrees C. When the desorption of an adsorption cell was observed using the phase-contrast microscope, it checked that desorption could be carried out by carrying out a rinse at 25 degrees C by PBS which added albumin 1%.

[0044] (Example 3) Let the copolymer (mol composition ratio 1:1) of the glycidyl methacrylate and methyl acrylate which have a peroxide machine in a principal chain be a polymerization initiator. The polymerization of the 80 degrees C of the N-isopropyl acrylamides was carried out in DMSO for 16 hours, and the block copolymer (mol composition ratio 4.8:1) which has poly (glycidyl methacrylate-methyl acrylate copolymer) as poly (N-isopropyl acrylamide) and a reactant domain as a stimulus responsibility domain was obtained.

[0045] 0. After mixing 60%DMSO solution which contains the above-mentioned block-copolymer 2wt% in 20%DMSO solution containing anti-CD4 5wt% antibody (Leu-3a) by 1:1, the polyethylene sheet which carried out surface graft polymerization was coated with the polymethacrylic acid, and it was made to react 60 degrees C for 40 hours.

[0046] The CD4+ cell (MT-4) was made to adsorb by contacting the leucocyte liquid (1x106-/ml) which washed into this material by the albumin addition PBS 1%, and was adjusted to it from the man fresh-blood buffy coat at 37 degrees C. When the desorption of an adsorption cell was observed using the phase-contrast microscope, it checked that desorption could be carried out by carrying out a rinse at 25 degrees C by PBS which added albumin 1%.

[0047] (An example 4, example 1 of comparison) It experimented using the fine porous membrane (the shape of 0.14 micrometers of average apertures, 80 micrometers of thickness, and a surface mesh) which has specific compatibility to a CD4+ cell (MT-4) and a target cell as a target cell and which makes polypropylene a principal component as pit CD4 antibody (Leu-3a) and a fine porous membrane as matter. Moreover, it experimented similarly, using a non-extended polypropylene film (60 micrometers of thickness) as an example 1 of comparison.

[0048] The block copolymer (mol composition ratio 4.5:1) of methoxy ethyl acrylate and glycidyl methacrylate was obtained by carrying out reduced pressure drying of the polymer by making into a polymerization initiator poly (glycidyl methacrylate) which has an azo machine in a principal chain, after carrying out the polymerization of the 80 degrees C of the methoxy ethyl acrylate in DMSO for 16 hours and making it reprecipitate in an isopropyl ether.

[0049] The fine porous membrane made from polypropylene was coated with the 2wt% tetrahydrofuran solution of this block copolymer. Then, after coating the methanol / water (1:1) solution of 0.5wt% polyethyleneimine (average molecular weight 1200), the fine porous membrane which combined polyethyleneimine with the base-material front face was obtained by making it react at 60 degrees C for 16 hours. Then, you poured 20ml (pH 4.5) of 20mg [/ml] 1-ethyl-3-(dimethylamino propyl) carbodiimide (sigma company make) solutions into the petri dish, and made it immersed at a room temperature for 3 hours. Then, after making it react, having made 50microg [/ml] solution of anti-CD4 antibody contact, and sometimes agitating at 4 degrees C for 16 hours, it washed by PBS.

[0050] The leucocyte liquid (1x106-/ml) which washed by the albumin addition PBS 1%, and was adjusted from the man fresh-blood buffy coat was contacted on the film of this material and the example 1 of comparison at 37 degrees C, and the CD4+ cell was made to stick to it. After the desorption of a cell added EDTA / trypsin solution, it was observed with the phase-contrast microscope. The fine porous membrane of the desorption of a cell was quicker as compared with the film.

[0051] (An example 5, example 2 of comparison) It experimented using the fine porous membrane (the shape of 0.47 micrometers of average apertures, 80 micrometers of thickness, and surface sponge) which has specific compatibility to a CD4+ cell (MT-4) and a target cell as a target cell and which makes poly vinylidene fluoride a principal component as anti-CD4 antibody (Leu-3a) and a fine porous membrane as matter. Moreover, it experimented similarly, using a poly vinylidene fluoride film (60 micrometers of thickness) as an example 2 of comparison.

[0052] Let poly (glycidyl methacrylate) which has a peroxide machine in a principal chain be a polymerization initiator. After carrying out the polymerization of the 80 degrees C of the N-isopropyl acrylamides in DMSO for 16 hours and making them reprecipitate in an isopropyl ether, the block copolymer (mol composition ratio 3.2:1) which has poly (glycidyl methacrylate) as poly (N-isopropyl acrylamide) and a reactant domain as a stimulus responsibility domain was obtained by carrying out reduced pressure drying of the polymer.

[0053] The fine porous membrane made from poly vinylidene fluoride was coated with the 2wt% tetrahydrofuran solution of this block copolymer. Then, after coating the methanol / water (1:1) solution of 0.5wt% polyethyleneimine (average molecular weight 1200), the stimulus response type separation material which combined polyethyleneimine with the front face was obtained by making it react at 60 degrees C for 16 hours. Then, you poured the 20mg [/ml] 1-ethyl-3-(dimethylamino propyl) carbodiimide (sigma company make) solution into 20ml (pH 5.5) petri dish, and made it immersed at a room temperature for 4 hours. Then, after making it react, having made 50microg [/ml] solution of anti-CD4 antibody contact, and sometimes agitating at 4 degrees C for 16 hours, the rinse was carried out by PBS.

[0054] After preparing a CD4+ cell to 1x106-/ml by PRMI1640 culture medium, the CD4+ cell was made to adsorb by making a sample contact at 37 degrees C. Although the adsorption cell was carrying out desorption by the fine porous membrane when observed with the phase-contrast microscope after adding PBS cooled at 4 degrees C, the cell which has not carried out desorption partially was observed with the film.

[0055] (An example 6, example 3 of comparison) It experimented like the example 5, using anti-CD4 antibody (Leu-3a) as matter which has specific compatibility to a CD4+ cell (MT-4) and a target cell as a target cell, using the filter made from polyurethane (the shape of 150 micrometers of thickness, 0.6 micrometers of average apertures, 1.4 micrometers, and surface sponge) as a base material. Moreover, it experimented similarly using the imperforation polyurethane film as an example 3 of comparison.

[0056] When the number of cells which carried out desorption recovery was compared, with 26000 pieces and an urethane film, the number of the urethane filters whose average apertures the number of the urethane filters whose average apertures are 0.6 micrometers is 51000, and are 1.4 micrometers is 22000, and the predominance of a fine porous membrane was checked.

[0057] (Example 7) The film of an example 5 was evaluated using the module for flat films (24cm of effective film

surfac products 2). this module be far apart with a film -- it has the space of two **, a liquid input and a liquid tap hole are in one space, and the input of recovery liquid is in another space
[0058] After preparing a CD4+ cell to 1x105-/ml by PRMI1640 culture medium, it pass d from 100ml and the liquid input to the liquid tap hole by the rate of flow of 2 ml/min at 37 degrees C. After cooling a module at 4 degrees C, from a membranous cell adsorption side and a membranous opposite side, recovery of a cell passed 20ml of PBS(s) cooled at 4 degrees C by the rate of flow of 2 ml/min, and collected them from the liquid tap hole. Cell recovery was 63%.

[0059]

[Effect of the Invention] A compatibility field [as opposed to a stimulus responsibility field and the target matter in the separation material of this invention] exists. Therefore, the volume change in a stimulus responsibility field becomes large, and the desorption of an adsorbate becomes easy to happen. Moreover, since a capping phenomenon when a target cell adsorbs by making phase separation structure form in a base-material front face can be suppressed, quality cells with few functional injuries can be collected.

[0060] Furthermore, by the fine porous membrane which limited the average aperture of the base material of the stimulus response type separation material of this invention, when an average aperture is smaller than the target matter, it will be caught on the front face of the real part of a fine porous membrane, and a hole part uneven in micro, a capping phenomenon will be avoided, and it will stick to the target matter soft. Therefore, the injury on a cell will decrease and the function of a cell in which it adsorbed will be maintained good. Furthermore, it becomes easy to carry out the desorption of the cell from a base material, since there are few cohesive sites with a base material as compared with a non-porosity front face.

[0061] Moreover, since a target cell does not pass a fine porous membrane but the trap is carried out to the membranous surface section by pouring cell recovery liquid from the field of an opposite side after the cell recovery method at the time of a fine porous membrane passes a processed liquid and makes a target cell adsorb from one membranous side, it enables a pressure for a cell to collect cells efficiently by this thing in the direction of a desorption plain-gauze cone.

[0062] Consequently, it will come to be able to perform separation refining of the conventionally difficult corpuscle system cell or a functional cell simple, and the separation material and technology of this invention will demonstrate an effect to the production and the cell therapy using separation of a target cell, proliferation, functional conversion, etc. of bioproducts, gene therapy, a diagnosis, etc. Moreover, this invention will discover an effect as new separation technology not only in a medical field but in various kinds of industrial fields.

[Translation done.]